

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経系障害に関する実験的研究
分担研究報告書（平成13年度）

視床下部機能の神経内分泌学的解析

分担研究者 西原 真杉 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室

研究要旨：周生期における内分泌かく乱化学物質の暴露による、新生期の視床下部における遺伝子発現への影響および成熟期での生殖内分泌系や性行動への影響を検討するため Wistar Imamichi 系ラットを用いた実験を行った。ジイソノニルフタレート、ジェニステイン、メトキシクロールなどの内分泌かく乱作用が疑われている化学物質を段階的な濃度で妊娠ラットに経口投与し、胎仔あるいは新生仔に移行させた。その雌動物では、成熟後において性周期の回帰異常、さらには発情前期午後に誘起される LH サージの低下やロードシス反射の減少が観察された。メトキシクロールとジイソノニルフタレートに関しては、これらのパラメータの多くは用量に関連した変動を示さなかったが、明らかに最低用量から変動を示していた。また、雄動物を用いて雄性行動の観察を行ったところ、マウント、挿入、射精などの雄性行動については有意な異常は観察されなかったが、エストロゲン作用の陽性対照を含む検索した全ての投与群で、血中 FSH 濃度の顕著な減少が観察された。以上の結果から、今後例数を増やしての追試確認が必要であるが、この系統のラットを用いた場合、雄での血中 FSH 濃度の減少、雌における性周期回帰の検討や発情前期午後に誘起される LH サージの発現変化が、EDCs の周生期暴露による性成熟後影響評価の非常に良いパラメータとなりうるものと考えられた。本研究では、母ラットの摂取量をモニターしていなかったため、1日あたりの化学物質の摂取量は求められなかったが、本実験条件下での NOAEL はメトキシクロールで 24 ppm 以下、ジイソノニルフタレートで 400 ppm 以下、ジェニステインで 200 ppm と考えられた。

A. 研究目的

哺乳動物における脳の機能的・形態的な雌雄差は、性行動の発現パターンや性腺刺激ホルモンの分泌パターンなどの雌雄差を引き起こす事が知られている。ラットの場合、出生後数日の特定の時期（臨界期）に精巣から分泌されるアンドロゲンが脳内で芳香化酵素によりエストロゲンへと代謝され、未分化な脳に作用して雄型に分化誘導すると考えられている。本研究は、内分泌攪乱化学物質(EDCs)がこのような脳の性分化の過程に in vivo においてどのように作用し、生殖機能に影響を与えるかを解明を目的としている。そこで平成 13 年度では、ジイソノニルフタレート、ジェニステイン、メトキシクロールなどの EDC 候補物質を段階的な濃度で妊娠ラットに経口投与し、成熟後の性行動や性周期回帰さらにはホルモンなどの影響について検討を行った。

B. 研究方法

動物は Wistar Imamichi 系ラットを用いた。被検物質として、ジイソノニルフタレート(D)、ジェニステイン(G)、メトキシクロール(M)について段階的な濃度で妊娠ラットに混餌による経口投与を行い、胎盤あるいは乳汁を経由して胎子あるいは新生仔に移行させた。処置群としてはD(400, 4000, 20000 ppm), G(200, 1000 ppm), M(24, 240, 1200ppm)、またはエチニルエストラジオール(EE; 0.00025, 0.0025, 0.025 ppm)を phytoestrogen 不含(SAF)の粉末飼料に混ぜ妊娠ラットに経口投与し、胎盤あるいは乳汁を経由して胎子あるいは新生仔に移行させた群(D, G, M, EE 群)と出生 2 日齢のラットにエストラジオールベンゾエート (EB) を 25 µg 皮下投与したもの (EB 群) およびそれらの対照群 (control ; CO 群) を設けた。これら処置群の雌雄ラットの成熟後、生殖内分泌系や性行動にどのような影響を与えるかを検討した。

雄ラットについてはまず雄性行動の観察を行っ

た。発情雌ラット（去勢雌ラットにエストロジェン・プロジェステロン処置したもの）と雄ラットをアクリルケージに入れ、暗視野ビデオカメラにて30分間の雄性行動を観察した。マウント、挿入、射精の頻度と各パラメータの初回行動までの時間、初回の射精後から再びマウントの発現する時間（射精後マウント潜時）を計測した。さらに尾静脈より採血を行い、血清中のLH、テストステロン(T)、卵胞刺激ホルモン(FSH)の濃度をラジオイムノアッセイ(RIA)およびELISA法により同定した。

雌ラットの生殖機能の検討としては、8週齢の雌ラットの性周期の回帰を膣スメアー法により観察した。その後、発情前期の12時と16時において尾静脈より採血し、血清中の黄体形成ホルモン(LH)の濃度をRIA法により同定した。さらに発情前期夕刻において、用手法により臀部に刺激を与えロードーシス反射の発現の比率（ロードーシス商）を同定した。

なおこれらの研究を行うに当たっては、東京大学農学部動物実験委員会に実験計画書を提出し、承認を得た上で実施している。

C. 研究結果

合成エストロジェン(EB, EE)とEDC候補物質(M, D, G)暴露を受けた雄ラットにおける射精に至った個体数とそのパーセントを表1に示す。EB群は射精まで至る個体が全体の12.5%と減少した。しかしEE, D, M, G処置群については、60%以上の個体が射精に至った。なおマウント、挿入および射精の頻度については、EB群のみにおいて挿入、射精の頻度の顕著な減少が観察されたものの、EDCs処置群についてマウント、挿入、射精などの雄性行動については有意な異常は観察されなかった。さらに初回までのマウント、挿入までの時間については、すべての処置群において差がなかった。

雄ラットにおける各種血清ホルモンについては、特にFSHについて、EB群を含むすべての処置群についてCO群に比べ減少していた(図1)。LHとテストステロンについては、Mの最高用量でLH

の低下が認められたが、それ以外の全ての群で影響は見られなかった。

雌ラットにおける成熟後の性周期回帰に対する影響については、D, M, G処置群すべてについて、発情期の日が2日連続するという、性周期回帰パターンの異常を示す個体が観察された(表2)。異常周期の発現した用量はMで24ppm, Gで1000ppmであり、Dでは最低用量と中間用量(4000, 20000ppm)のみで認められた。発情前期夕刻のロードーシス反射の出現については、EBを含むすべての処置群において50%以下のロードーシス商を示したが、用量依存性は明らかではなかった(図2)。さらに図3に示すように、CO群では発情前期夕刻16時において血中LH濃度の上昇(LHサーージ)が観察されるが、D(4000ppm)群とM(1200, 240, 24ppm)群、EB群において、発情前期16時における血中LH濃度は有意に減少していた。また、M群でのLH濃度減少には用量依存性が明らかではなかった。

D. 考察

雄ラットの性行動については、明らかな雄性行動の異常は観察されなかった。雄ラットにおける雄性行動を司る神経系の形成に対して、今回用いたEDC候補物質の種類及び濃度では影響を及ぼさないという結果となった。なお昨年度にEE群によるマウント頻度の上昇、初回までのマウント、挿入までの時間の短縮が観察された。今回の結果は昨年度のものとは異なる結果となったが、これは今回は化学物質の混餌投与にSAF飼料を使用したことが、前回は通常の飼料を使用したことに起因する可能性が考えられる。

しかしながら血中FSH濃度については、D(400-20000ppm), M(24-1200ppm), G(1000ppm)各々の暴露により顕著な減少が観察された。その意義は現時点では明らかではないが、周生期におけるこれらの化学物質暴露が雄ラットの性成熟後のホルモン分泌に影響を及ぼしたことを示すものである。この血中FSH濃度の低下については、今後これらの動物の精子形成能を解析するな

ど、精巣機能に対する影響を評価する必要があると考えられる。また、この現象の原因として、視床下部-下垂体-精巣のどのレベルの影響が主体となっているのかを突き止めることも今後の課題と考えられる。

新生期の EB 処置により、成熟後の雌ラットの性周期の回帰パターンの異常や発情前期夕刻における LH サージの減少が観察された。これらの結果は新生期の大量のエストロジェン曝露による脳の性分化の異常により、ゴナドトロピンサージおよび排卵が起こらなくなったことを強く示唆するものである。M 曝露例でも用量依存性は明らかではないが LH サージの減少が 24 ppm から認められ、性周期異常に関しては用量に依存した発現頻度を示した。この他、D 曝露例で用量に依存せずに性周期異常を認め、G 曝露例でも 1000 ppm で性周期異常を認めた。ただ、いずれの EDC 曝露群においても EB 処置群とは異なり性周期は回帰しているため、排卵自体は起こっているものと考えられる。排卵数への影響の検討が今後必要となろう。

更に、用量依存性はないものの、M、G、D 曝露例で雌性行動であるロードーシスの低下が観察された。異常の結果の多くは用量に関連した変動を示さなかったが、胎仔期・新生期において形成される雌性行動を司る神経系に対して、外因性のこれらの物質の曝露が影響を及ぼしたと考えられる。

E. 結論

我々は昨年度までに、上皮系の細胞の成長を調節する因子として知られるグラニューリン遺伝子が、性分化期の視床下部における EDCs の標的遺伝子である可能性が高いことを示している。これに加えて、脳の性分化の時期である胎仔期、新生仔期における EDC の曝露の成熟後の影響についての検討を行う上で、雄での血中 FSH の減少、雌における性周期回帰の検討や発情前期午後に誘起される LH サージの発現変化が、胎仔期、新生仔期における EDC 曝露の脳に対する影響を解析するための有用なパラメータとなりうるものと考えられたが、

今後、例数を増やしての追試確認が必要であると考えられた。さらに、精子形成能や排卵数を確認するとともに、ロードーシス反射などを含めた生殖能力に対する影響を総合的に評価するために、実際にこれらに雌雄動物を用いて繁殖を行い、その効率を検討することも必要であると考えられる。

本研究では、母ラットの摂餌量をモニターしていなかったため、1日あたりの化学物質の摂取量は求められなかったが、Wistar Imamichi 系ラットを用いた場合、本実験条件下での NOAEL はメトキシクロールで 24 ppm 以下、ジイソノニルフタレートで 400 ppm 以下、ジェニスタインで 200 ppm と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Induction of granulin precursor gene expression by estrogen treatment in neonatal rat hypothalamus. *Neuroscience Letters*, 297,199-202, 2001(鈴木らと共著)
- 2) Estrogen affects gene expression of estrogen receptors, androgen receptor, and aromatase in the neonatal rat hypothalamus. *J. Reprod. Dev.*, 48, 17-23, 2002 (鈴木らと共著)
- 3) Granulin precursor gene; a sex-steroid inducible gene involved in sexual differentiation of the rat brain. *Mol. Genet. Metab.*, 75, 31-37, 2002 (鈴木らと共著)

2. 学会発表

- 1) グラニューリン前駆体蛋白のラット脳における免疫組織学的解析(鈴木らと共著)第24回 日本神経科学大会、2001年9月、京都
- 2) 脳の性分化の誘導機構について 第94回日本繁殖生物学会シンポジウム、2001年9月、東京
- 3) 脳と性差 第4回万有製薬シンポジウム 若手研究者のための薬理学セミナー、2001年10

月，東京

G. 知的所有権の取得状況

特になし

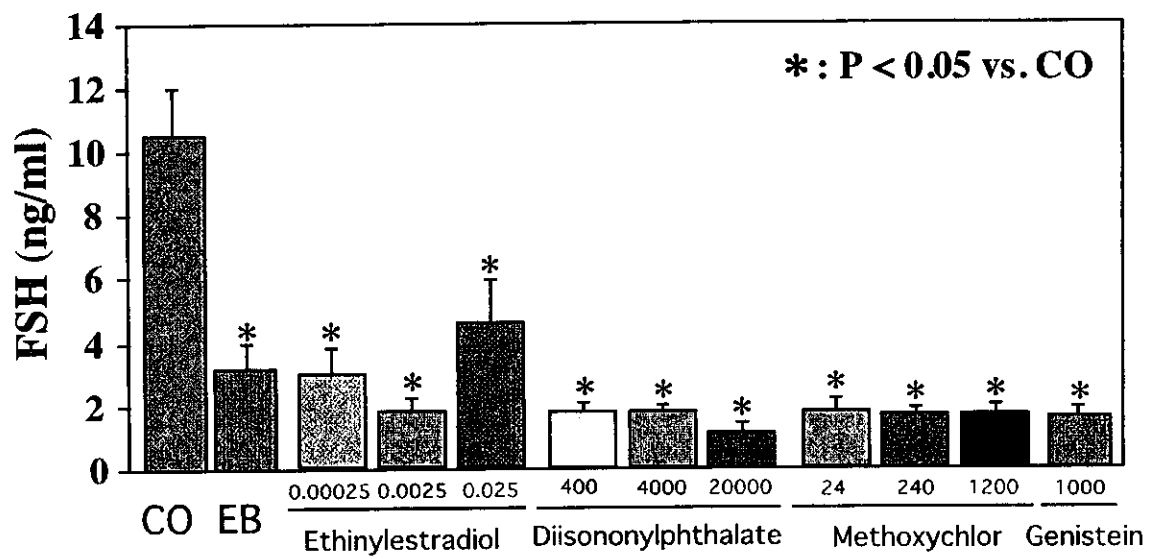


図1 新生仔時期に化学物質暴露を受けた雄ラットの血中FSH濃度

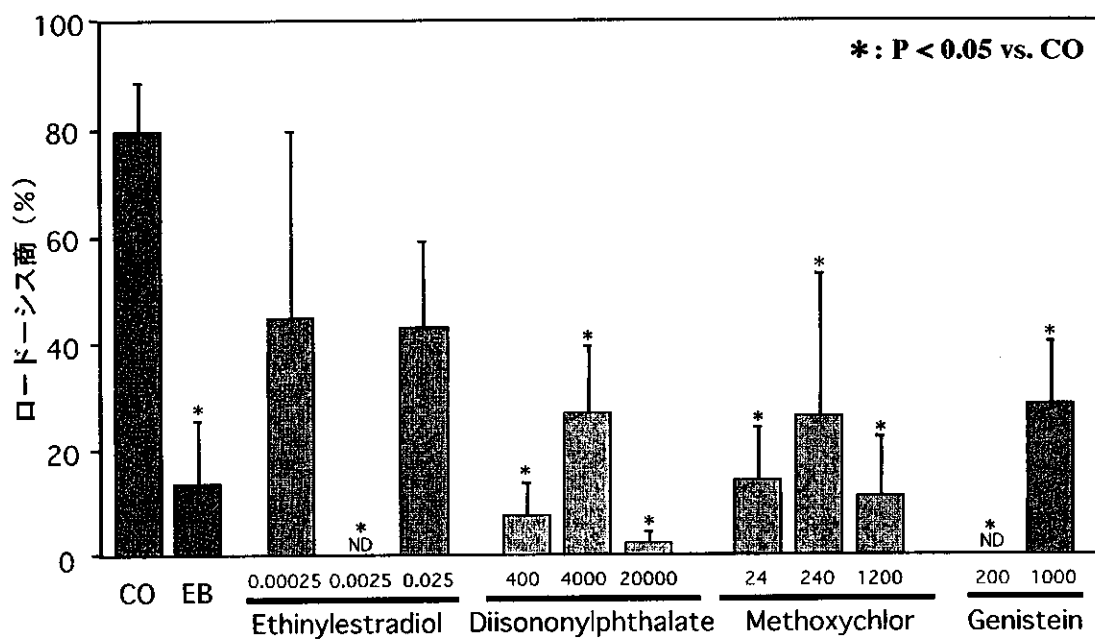


図2 新生仔時期に化学物質暴露を受けた雌ラットのロードーシス反射

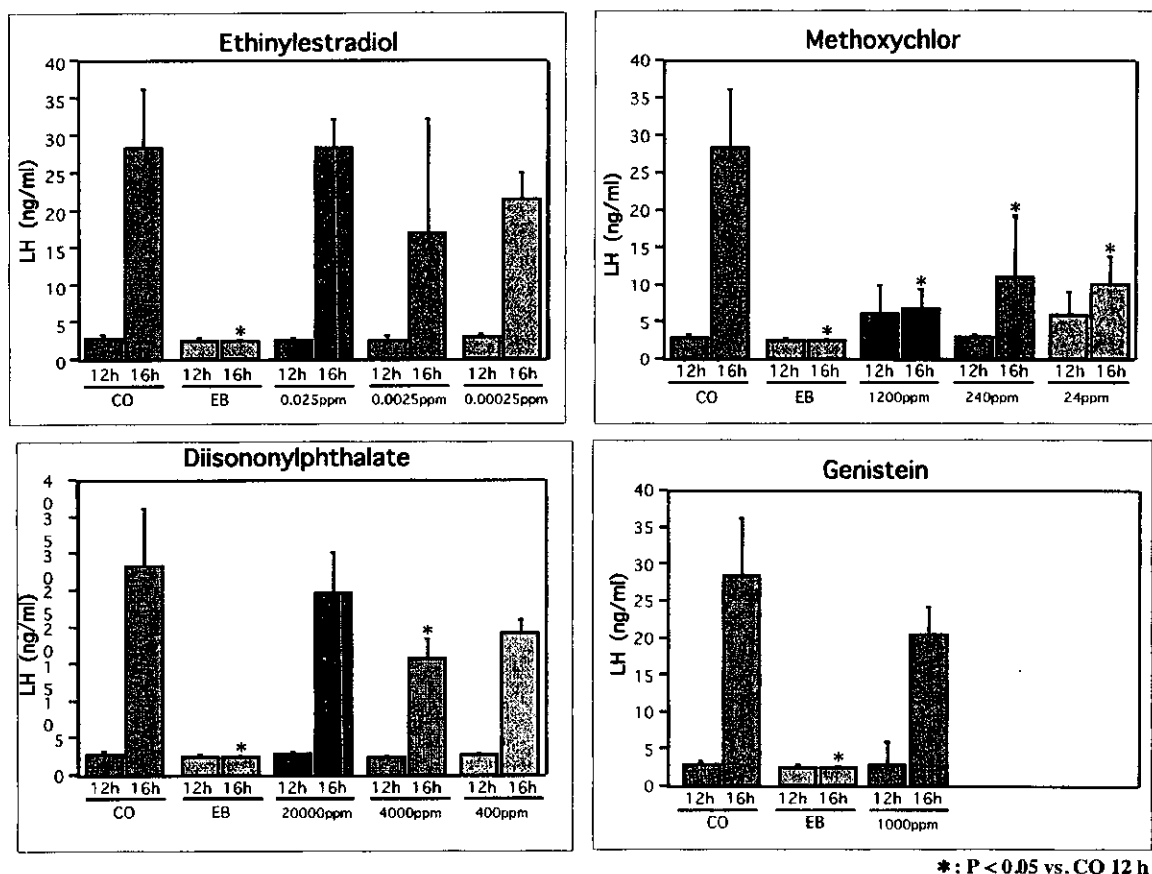


図3 発情前期午後の雌ラットにおけるLHサージへの影響

	ppm	総数	射精した 個体数	パーセント(%)
CO		9	9	100
EB		8	1	12.5
EE	0.025	10	7	70
	0.0025	9	6	66.7
	0.00025	3	2	66.7
D	20000	3	2	66.7
	4000	7	5	71.4
	400	9	8	88.9
M	1200	5	3	60
	240	6	4	66.7
	24	6	4	66.7
G	1000	4	3	75
	200	1	0	0

表1 化学物質を周産期暴露した雄性ラットにおける射精に至った個体数とそのパーセント

	ppm	総数	性周期異常 の個体数	パーセント(%)
CO		4	0	0
EB		5	5	100
EE	0.025	11	3	27.3
	0.0025	3	0	0
	0.00025	4	0	0
D	20000	4	0	0
	4000	10	3	30
	400	8	4	50
M	1200	9	6	66.7
	240	4	2	50
	24	8	1	12.5
G	1000	13	3	23.1
	200	4	0	0

表2 化学物質を周産期暴露した雌性ラットにおける性周期異常の
個体数とそのパーセント

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経系障害に関する実験的研究
（分担）研究報告書（平成13年度）

血液脳関門及びグリア細胞への影響の *in vitro* 評価
（分担）研究者 浅井 清文 名古屋市立大学大学院医学研究科教授

研究要旨：内分泌かく乱物質（EDCs）の血液脳関門（blood-brain barrier: B-BB）への影響を検討するにあたり、脳毛細血管内皮細胞を安定供給する目的で、ウシ脳毛細血管内皮細胞の不活化を行った。この不活化ウシ脳毛細血管内皮細胞（t-BBEC-117）を用い *in vitro* B-BB model を作製し、EDCs が物質透過性にどのような影響を与えるか検討した。その結果、EDCs 及び Estradiol は、細胞間隙を透過する L-glucose の透過性を抑制することが判明した。EDCs の一種である Diisononyl phthalate 投与によって、その用量依存性に一酸化窒素(NO)産生を抑制する効果が検出された。さらに Wortmannin および L-nitroarginine methylester (L-NAME)投与によって 17 β -estradiol による物質透過性を抑制効果が消失したことから、17 β -estradiol による脳毛細血管内皮細胞の物質透過性制御に、PI3K を介した NO のシグナルが直接関与している事実が判明し、NO 産生量の測定系が EDCs の評価系として利用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

血液脳関門（blood-brain barrier: B-BB）は脳への物質の移行を制限し、中枢神経系の恒常性を維持する機構として知られている。内分泌かく乱物質（EDCs）の中枢神経系への影響を検討するにあたって、EDCs が B-BB をどの程度通過するか、そして、EDCs が B-BB そのものの特性を変化させるものか、把握しておく必要がある。研究者らは、すでに、ウシ脳毛細血管内皮細胞(BBEC)とラットアストロサイトを共培養することにより、培養系を利用した B-BB モデル (*in vitro* B-BB モデ

ル)を確立しているが、脳毛細血管内皮細胞の採取は難しく、今後、実験を進めるに当たって、脳毛細血管内皮細胞を安定供給する必要があった。そこで11年度は、不活化ウシ脳毛細血管内皮細胞 (t-BBEC-117) の樹立を行い、*in vitro* B-BB モデルに利用できるかどうか検討した。12年度は、この細胞を用いた *in vitro* B-BB モデルにおいて、EDCs が物質透過性に与える影響を検討した。また、血液脳関門機能に影響を与えるグリア細胞の遺伝子発現が 17 β -estradiol により、どのような影響を受けるか DNA microarray を用いて

解析した結果 myelin basic protein、myelin proteolipid protein、cationic amino acid transporter が強く誘導されることを見い出している。13 年度は 17β -estradiol が細胞間隙の物質透過性を抑制するメカニズムを L-glucose を用いて検討し、さらにシグナル伝達阻害剤による薬理学的手法を用いて脳毛細血管内皮細胞の物質透過性制御にかかわるシグナル伝達系の解明をめざした。

B. 研究方法

1. 不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞(t-BBEC-117)の培養と in vitro B-BB モデル
不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞(t-BBEC-117)は、10%胎児ウシ血清を含むダルベッコ改変イーグル培地に G418 (200 mg/ml) を添加したもので継代した。in vitro B-BB モデル用には、Snapwell (直径 12mm、Costar 社) に 5×10^5 細胞を播種し、3 日間培養したものを使用した。

2. In vitro B-BB モデルにおける物質透過性の測定

1 で t-BBEC-117 細胞を培養した Snapwell を拡散チャンバーに装着し、ついで、内皮細胞側 (血管内腔側に相当) に細胞間隙のみを通過する [^{14}C]-L-glucose を添加した。その後、反対側のチャンバー (脳実質側に相当) に透過してくる [^{14}C]-L-glucose の量を、経時的に培地を少量採取し、液体シンチレーションカウンターで

放射活性を測定することにより定量した。
Estradiol を作用させた上で phosphatidylinositol-3 kinase(PI3K)阻害剤である Wortmannin を 30 nM 加えた場合および、NOS (NO synthase) 阻害剤である L-nitroarginine methylester (L-NAME) を 100 nM 加えた場合を比較した (fig.1)。

3. 脳毛細血管内皮細胞からの NO 産生量の定量化

NO の産生量は t-BBEC-117 細胞を 24 well dish のそれぞれの well に 5×10^5 細胞を播種し、3 日間培養したものを使用した。培養液を除去した後に Hanks' balanced salt solution (HBSS) で洗浄し 500 μl の HBSS に diisononyl phtalate、flutamide、bis(2-ethylhexyl)ester、vinclozolin、methoxychlor、tamoxifen、bisphenol A、p-hydroxybenzoic acid n-butyl ester、 17β -estradiol をそれぞれ 1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM 10 nM の濃度で加えた。NO 産生量の測定には蛍光色素 diaminofluorescein (DAF-2) 100 nM の HESS 溶液を呈色反応液として培養細胞へ加えて 2 時間処理した上で、その上清 200 μl に 1N NaOH を 10 μl を加えて pH11 以上とした溶液を試料として黒色 96 穴マイクロプレートに移し、Microplate fluorescence reader FL600 (Bio-Tek Instruments, Inc.) で蛍光強度を数値化して比較検討した。

C. 研究結果

1. In vitro B-BB モデルにおける t-BBEC-117 細胞の物質透過性に関与する 17β -estradiol の作用機構を解明するために、 17β -estradiol と同時に Phosphatidylinositol-3 kinase(PI3K)の阻害剤である Wortmannin 30 nM を作用させたところ 17β -estradiol による L-glucose の透過性の抑制効果が消失した。Wortmannin の単独投与では、透過性に変化が見られていない。 17β -estradiol と同時に NO synthase (NOS) 阻害剤である L-nitroarginine methylester (L-NAME) 100 μ M を作用させたところ Wortmannin の効果と同様に 17β -estradiol による透過性抑制効果が消失した。(Fig. 1)。

2. t-BBEC-117 細胞を diisononyl phtalate 1 pM から 10 nM の範囲で処理した場合に用量依存的に NO 産生を抑制される傾向が検出された。ただし 17β -estradiol を含めて他の EDCs 投与による t-BBEC-117 からの NO 産生量には著明な傾向は検出できなかった(Fig. 2、3)。

D. 考察

1. ウシ脳毛細血管内皮細胞を不死化して得られた t-BBEC-117 は脳毛細血管内皮細胞としての特性を有しており、in vitro B-BB モデルに利用することができた。

2. In vitro B-BB モデルに対し、 17β -estradiol 及び各種 EDCs で処理した場合に、即時的に L-glucose の透過性が低下した。即時的反応である物質透過性の変化は、

作用させた薬物が細胞内レセプターを介して遺伝子転写調節を介した反応として考えるには余りにも短時間の反応である。そこで細胞膜上にあるレセプター（ないし類似作用を持つ蛋白）を介して細胞質内で即時的に反応している可能性が示唆された。事実、即時的な物質透過性の抑制効果は Wortmannin の投与で消失することから PI3K を介したシグナル伝達系が直接関与していることがわかり、L-NAME を投与することでも、 17β -estradiol の即時的な物質透過性の抑制効果が消失したことから、最終的には NO が物質透過性制御のシグナルになることが示された。従来 17β -estradiol はエストロジェンレセプターを介した核内の遺伝子転写調節因子として考えられてきたが、核内因子としてのみならず、細胞質内の情報伝達シグナルの制御機能を有することが今回の研究で明らかとなった。この事実から EDCs の効果を検討するに当たり、核内の遺伝子転写調節の観点ばかりではなく、細胞質内での情報伝達シグナルかく乱の可能性からも検討する必要性が明らかとなった。

3. Diisononyl phtalate の投与効果が、NO 産生低下傾向として見いだされた事実は、昨年度までに t-BBEC-117 細胞へ Diisononyl phtalate を投与した場合に L-glucose の透過性の抑制効果を見出せなかった事実を説明するものと考えられる。ただし他の EDCs に関する NO 産生量の

測定結果は厳密な評価が難しい段階である。その原因として、今回用いた NO 測定系の検出限界が問題点と考えられている。DAF-2 による測定系は細胞外へ放出される NO を蛍光色素である DAF-2 が捕捉した結果の蛍光強度が変化する現象を基準とした実験系であり、NO が拡散する問題点と検出精度が NO 濃度 10 nM 以上必要となる限界がある。今後は細胞内へ浸透する DAF-2 DA を用いて細胞内で NO を捕捉し、より厳密に NO 産生量を定量化できるように実験系を検討する必要がある。

E. 結論

1. 脳毛細血管内皮のモデル細胞である t-BEEC-117 細胞へ PI3K の阻害剤 Wortmannin を投与することによって、 17β -estradiol による物質透過性の抑制反応が消失した。この結果は、脳毛細血管内皮細胞の物質透過性制御に関わる 17β -estradiol の効果は、細胞質に存在する PI3K 活性化シグナルを介していることを示している。

2. 17β -estradiol による即時的な物質透過性の変化は L-NAME 投与によって消失することから、NO 産生量が物質透過性に直接影響を与えていることが示された。

1 および 2 の結果から 17β -estradiol の物質透過性制御機構は PI3K の活性化シグナルを介した NOS の活性化に関わり、最終的に NO が重要な役割を果たしていると

結論付けられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yokoi, T., Yamamoto, N., Tada, T., Fujita, M., Moriyama, A., Matsui, H., Takahashi, T., Togari, H., Kato, T., Asai, K. Developmental changes and localization of mouse brain serine proteinase mRNA and protein in mouse brain. Neuroscience Letters (in press)

Yoneda, K., Yamamoto, N., Asai, K., Sobue, K., Fujita, Y., Fujita, M., Mase, M., Yamada, K., Nakanishi, M., Tada, T., Miura, Y., Kato, T. Regulation of aquaporin-4 expression in astrocytes. Mol. Brain. Res. 89(2001)94-102

Yamamoto, N., Yoneda, K., Asai, K., Sobue, K., Tada, T., Fujita, Y., Katsuya, H., Fujita, M., Aihara, N., Mase, M., Yamada, K., Miura, Y., Kato, T. Alteration in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation. Mol. Brain Res. 90(2001)26-38

Miyachi, T., Asai, K., Tsuiki, H., Mizuno, H., Yamamoto, N., Yokoi, T., Aoyama, M., Togari, H., Wada, Y., Miura, Y. and Kato, T. Interleukin-1 β induces the expression of lipocortin 1 mRNA in cultured rat cortical astrocytes. Neurosci. Res. 40(2001)53-60

Nakanishi, K., Kukita, F., Asai, K., Kato, T. Recurrent subthreshold electrical activities of rat neocortical neurons progress during long-term culture. *Neurosci. Letters* 304(2001)85-88

Morikawa, M., Asai, K., Kokubo, M., Fujita, K., Yoneda, K., Yamamoto, N., Inoue, Y., Iida, J., Kishimoto, T. and Kato, T. Isolation and characterization of a new immortal rat astrocyte with a high expression of NGF mRNA. *Neurosci. Res.* 39(2001)205-212

Kataoka, H., Miura, Y., Joh, T., Seno, K., Tada, T., Tamaoki, T., Nakabayashi, H., Kawaguchi, M., Asai, K., Kato, T. and Itoh, M. Alpha-fetoprotein producing gastric cancer lacks transcription factor ATBF1 *Oncogene* 20(2001)869-873

Aoyama, M., Asai, K., Shishikura, T., Kawamoto, T., Miyachi, T., Yokoi, T., Togari, H., Wada, Y., Kato, T. and Nakagawara, A. Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett.* 164(2001)51-60

Higashida, H., Hashii, M., Yokoyama, S., Hoshi, N., Asai, K., and Kato, T. Cyclic ADP-ribose as a potential second messenger for neuronal Ca^{2+} signaling. *J. Neurochem.* 76(2001)321-331

Fujita, M., Aihara, N., Yamamoto, M., Ueki, T., Asai, K., Tada, T., Kato, T., and Yamada, K. Regulation of rat hippocampal neural cadherin in the kainic acid induced seizures. *Neuroscience Letters* 297(2001)13-16

Katano, H., Fujita, K., Kato, T., Asai, K., Kawamura, Y., Masago, A., Yamada, K. A metabotropic glutamate receptor antagonist, α -methyl-4-carboxyphenylglycine, attenuates immediate early gene mRNA expression following traumatic injury in cultured rat cortical glial cells. *Neuroscience Letters* 306(2001)101-105.

Yamamoto, N., Sobue, K., Miyachi, T., Inagaki, M., Miura, Y., Katsuya, H., Asai, K. Differential regulation of aquaporin expression in astrocytes by protein kinase C. *Mol. Brain Res.* (2001)110-116

Nishiwaki, A., Asai, K., Tada, T., Ueda, T., Shimada, S., Ogura, Y., Kato, T. Expression of glia maturation factor during retinal development in the rat. *Mol. Brain Res.* (2001)103-109

2. 学会発表

Kato, K., Mase, M., Masago, A., Aihara, N., Yamada, K., Yamamoto, N., Asai, K. (2001) Brain edema and glial cells: Role of the water channel Aquaporin-4 in

Brain edema 第 11 回脳血管シンポジウム 2001.9.1 大阪

Nakanishi, K., Asai, K., Kato, T. (2001) Recurrent subthreshold electrical activities of rat neocortical neurons in long-term culture. Society for Neuroscience 31th Annual Meeting 2001.11.10-15. San Diego, California, U.S.A.

Fujita, M., Ueki, T., Miura, Y., Asai, K., Yamada, K., Kato, T. (2001) Epidermal growth factor decreases connexin-43 expression in cultured rat cortical astrocytes. Society for Neuroscience 31th Annual Meeting 2001.11.10-15. San Diego, California, U.S.A.

Aoyama, M., Asai, K., Shishikura, T., Ohira, M., Inuzuka, H., Morohashi, A., Kato, T., Nakagawara, A. (2001) High expression of human rim gene in neuroblastomas with favorable biologies. Society for Neuroscience 31th Annual Meeting 2001.11.10-15. San Diego, California, U.S.A.

稲垣雅昭、祖父江和哉、多田豊曠、浅井清文、津田喬子、勝屋弘忠 (2001) Glia Maturation Factor (GMF) 測定法の確立とその臨床的意義 日本麻酔学会第 48 回大会 4.26-27, 神戸

藤田政隆、相原徳孝、山本愛美、山本直樹、浅井清文、多田豊曠、加藤泰治、山田和雄 (2001) カイニン酸誘発てんかんモデルでのラット海馬内における N-カドヘリンの変化 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 9.26-28, 京都

山本直樹、浅井清文、祖父江和哉、多田豊曠、藤田政隆、山田和雄、三浦 裕、加藤泰治 (2001) 培養アストロサイトにおける低酸素-再酸素化における AQPs 遺伝子の発現変化 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 9.26-28, 京都

青山峰芳、浅井清文、穴倉朋胤、太平美紀、犬塚博之、諸橋愛子、赤澤智宏、高坂新一、加藤泰治、中川原 章 (2001) シナプス形成関連遺伝子 nbla0761/RIM1 の神経芽細胞腫における発現とその解析 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 9.26-28, 京都

中西圭子、浅井清文、加藤泰治 (2001) ラット大脳皮質ニューロンのシナプス発達における GABA の役割 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 9.26-28, 京都

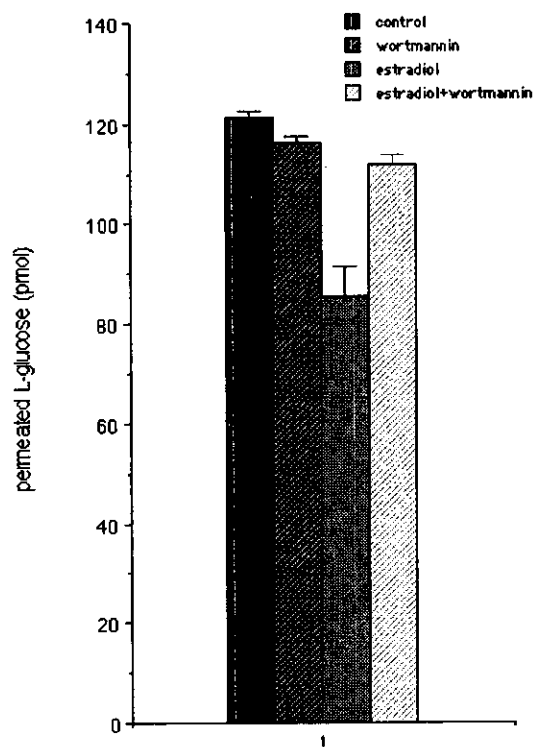
植木孝俊、藤田政隆、浅井清文、佐藤康二、山田和雄、加藤泰治 (2001) Epidermal

growth factor (EGF) による大脳皮質初代培養アストロサイトでの connexin-43 の発現の低減について 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 9.26-28, 京都

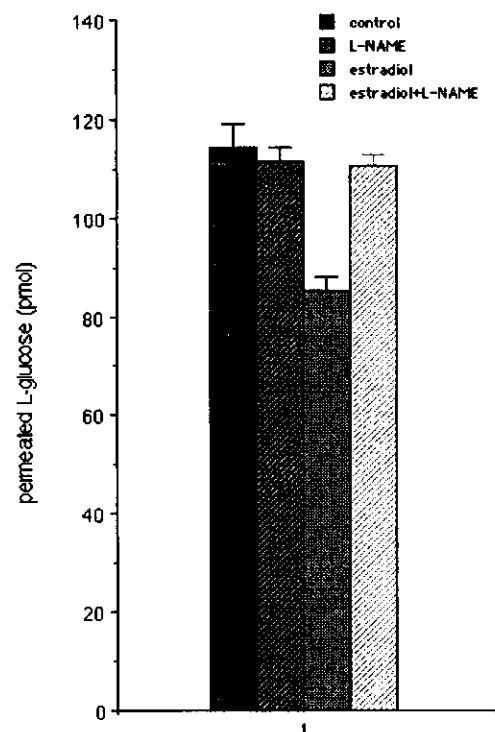
藤田政隆、植木孝俊、浅井清文、加藤泰治、山田和雄 (2001) 大脳皮質初代培養アストロサイトにおける epidermal growth factor (EGF) によ connexin-43 の発現の低

減 第 60 回日本脳神経外科学会総会 岡山

祖父江和哉、山本直樹、稲垣雅昭、藤田義人、浅井清文、津田喬子、勝屋弘忠 (2002) 脳冷凍損傷モデルにおけるアクアポリン発現の変化と脳浮腫への関与 第 29 回日本集中治療医学会大会 2.28-3.2, 岡山



Wortmannin



L-NAME

Fig. 1. エストラジオールによるL-glucose透過性抑制作用
に対するWortomanninないしL-NAMEの効果

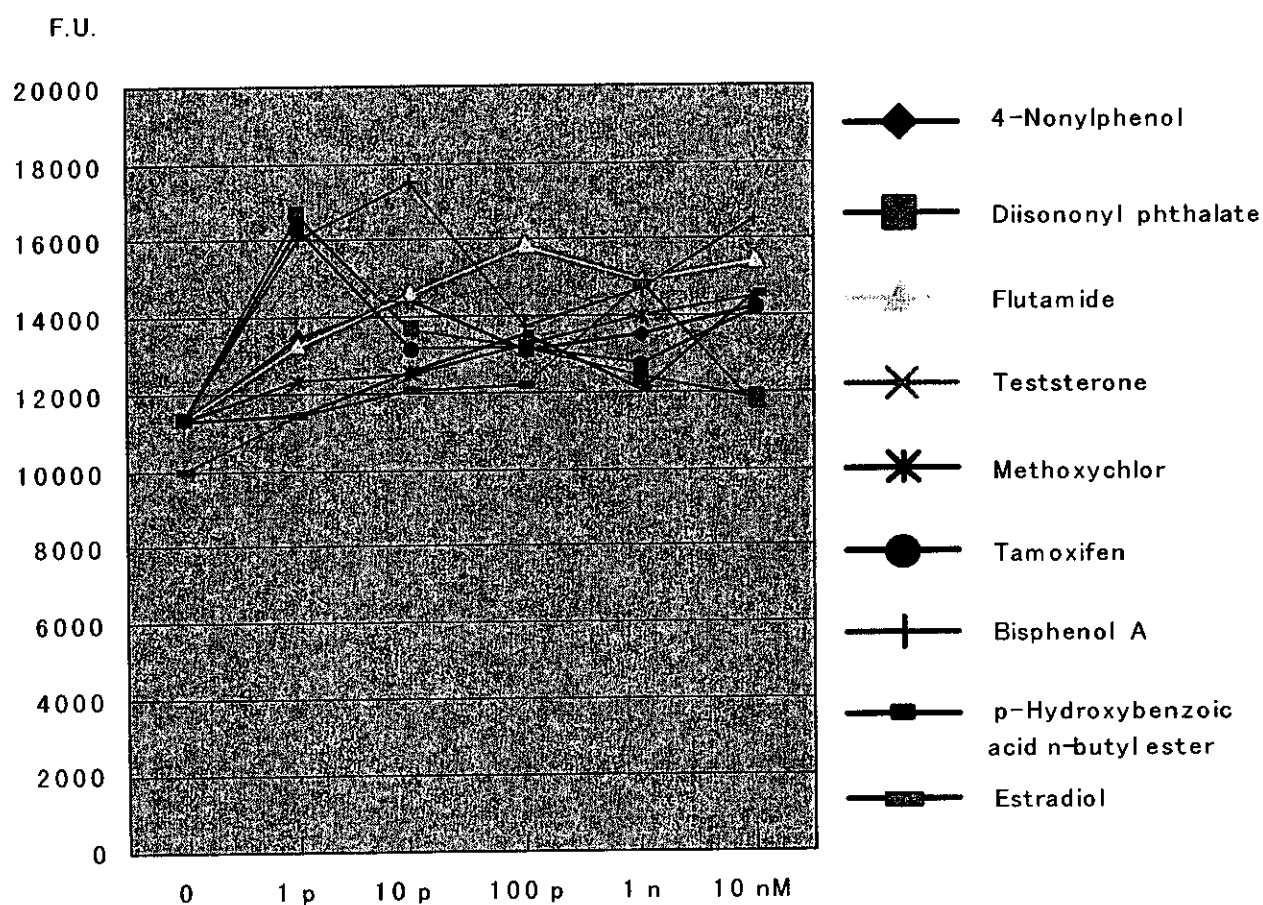


Fig. 2. 各種EDC候補物質を作用させた時のt-BBEC-117細胞からのNO産生の用量反応性

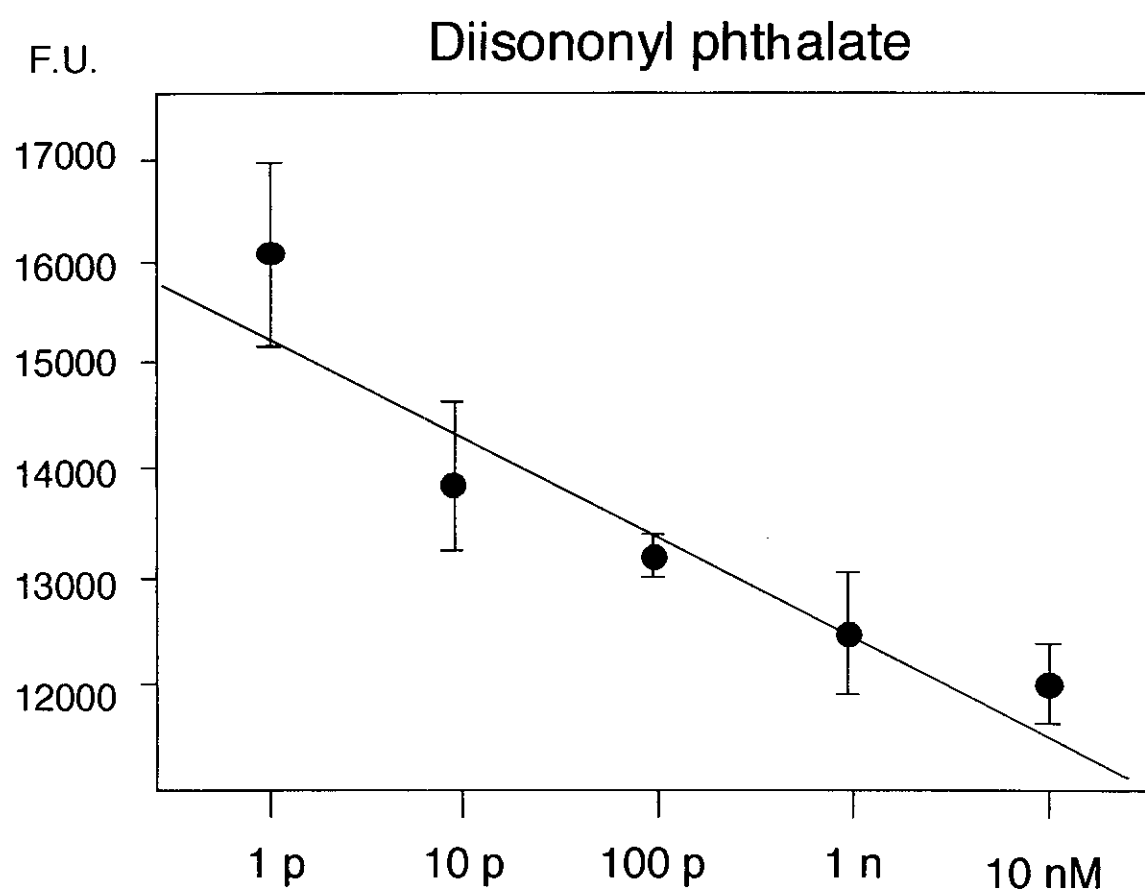


Fig. 3. Diisononyl phthalate を作用させた時のt-BBEC-117細胞からのNO産生の用量反応性

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経系障害に関する実験的研究
分 担 研 究 報 告 書（平成13年度）

—培養中枢ニューロンに対する評価—

分担研究者 榎戸 靖 大阪大学蛋白質研究所・助手

研究要旨：内分泌かく乱化学物質の中枢神経系への作用を *in vitro* で評価する目的で、ラット培養海馬ニューロンの血清除去による細胞死の系を確立した。この系を用い、エストロゲンによる培養海馬ニューロンへの生存維持作用を解析した。その結果、エストロゲンや内分泌かく乱化学物質の候補と考えられている Bisphenol A や 4-Nonylphenol 等が血清除去によるニューロン死を一部抑制することを見いだした。次にエストロゲンが、神経栄養因子として知られるインシュリンや IGF-1 との共存下でニューロンの生存を著しく増強することを見出した。さらに内分泌かく乱化学物質もエストロゲンと同様インシュリンや IGF-1 と共に生存維持効果の増強をもたらすことから、本研究で用いた実験系は脳神経系の分化・発達および機能維持に必要な神経栄養因子の作用に内分泌かく乱化学物質が与える影響を調べるうえで優れた評価系になると考えられた。これら神経栄養因子と内分泌かく乱化学物質のクロストークは、これまで知られていなかった内分泌かく乱化学物質による発達期中枢神経系障害の発症機構として注目すべきものと考えられる。

A. 研究目的

ラット胎仔海馬培養ニューロンを用い、それらに対するエストロゲンならびに内分泌かく乱化学物質による生存維持作用を指標とした評価系を確立する。これらを用い、脳神経系の形成や神経細胞分化に深く関わることで知られる神経栄養因子の作用にエストロゲンや内分泌かく乱化学物質がどのような影響を与えるか細胞ならびに分子レベルで調べる。

B. 研究方法

胎仔19日齢ラット海馬ニューロンを実体顕微鏡下で摘出し、パバイン法により分散培養を行った。内分泌かく乱化学

物質および神経栄養因子存在下で培養した後、各種抗体による免疫組織染色、MTT法による生存率の測定を行った。さらに、ウェスタンブロッティングによるMAPキナーゼならびにPI3キナーゼを介した細胞内シグナル伝達経路の解析を行った。

（倫理面への配慮）

初代培養に用いる実験動物、ならびにその飼育等については実験動物使用規定に従って行っており、倫理面での問題はない。

C. 研究結果